

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 A61K 39/395, C07K 16/28		A1	(11) 国際公開番号 WO97/22361 (43) 国際公開日 1997年6月26日(26.06.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/03673 (22) 国際出願日 1996年12月17日(17.12.96) (30) 優先権データ 特願平7/329010 1995年12月18日(18.12.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 大塚製薬株式会社 (OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒101 東京都千代田区神田司町2丁目9番地 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 岡山秀親(OKADA, Hidechika)[JP/JP] 岡田則子(OKADA, Noriko)[JP/JP] 〒467 愛知県名古屋市瑞穂区中山町1丁目10-1-206 Aichi, (JP) (74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外(ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 國際調査報告書	
(54) Title: SUGAR CHAIN-RECOGNIZING ANTIBODY AND REMEDY FOR INFECTION WITH HIV (54)発明の名称 糖鎖認識抗体及びHIV感染症治療剤			
(57) Abstract A sugar chain-recognizing antibody belonging to IgM which recognizes Gg4Cer(Galβ1-3GalNacβ1-4Galβ1-4GlcβCer) or GM2 and a remedy for infection with HIV which contains the IgM.			
BEST AVAILABLE COPY			

(57) 要約

本発明は、Gg4Cer (Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4GlcβCer) 又はGM2を認識するIgMに属する糖鎖認識抗体、及び該IgMを含有するHIV感染症治療剤に関する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

A L	アルバニア	E E	エストニア	L R	リベリア	R U	ロシア連邦
A M	アルメニア	E S	スペイン	L S	レソト	S D	スーダン
A T	オーストリア	F I R	フィンランド	L T	リトアニア	S E G	スウェーデン
A U	オーストラリア	F R	フランス	L U	ルクセンブルグ	S S G	シンガポール
A Z	アゼルバイジャン	G A	ガボン	L V	ラトヴィア	S K	スロヴェニア
B B	バルバドス	G B E	イギリス	M C	モナコ	S N	スロヴァキア共和国
B E	ベルギー	G E H	グルジア	M D	モルドバ	S Z	セネガル
B F	ブルギナ・ファソ	G N	ガーナ	M G	マダガスカル	T D	スウェーデン
B G	ブルガリア	G R	ギニア	M K	マケドニア旧ユーゴスラ	T G	チャード
B J	ベナン	H U E	ハンガリー	M L	マリ	T J	トーゴ
B R	ブラジル	I S T	アイルランド	M N	モンゴル	T M	タジキスタン
B Y	ベラルーシ	J P E	アイスランド	M R	モーリタニア	T R	トルコメニスタン
C A	カナダ	K E	日本	M W	マラウイ	T T	トリニダード・トバゴ
C F	中央アフリカ共和国	K E G	ケニア	M X	メキシコ	U A G	ウクライナ
C G	コンゴ	K G	キルギスタン	N E	ニジエール	U U S	ウガンダ
C H	イスス	K P	朝鮮民主主義人民共和国	N L	オランダ	V V N	米国
C I	コート・ジボアール	K R	大韓民国	N O	ノルウェー	U U Z	ウズベキスタン共和国
C M	カーメーン	K Z	カザフスタン	N Z	ニュージーランド	Y U	ヴィエトナム
C N	中国	L I	リヒテンシュタイン	P L	ポーランド		ヨーロッパ
C Z	チェコ共和国	L K	スリランカ	P T	ポルトガル		
D E	ドイツ			P R O	ルーマニア		
D K	デンマーク						

明細書

糖鎖認識抗体及びHIV感染症治療剤

技術分野

本発明は新規な糖鎖認識抗体、より詳しくはHIV感染細胞に発現する糖鎖を認識するIgMに属する抗体及びこれを有効成分とするHIV感染症治療剤に関する。

背景技術

AIDS (Acquired immunodeficiency syndrome) は、1981年にサンフランシスコにおいて、ホモセクシャルの男性の致命的な免疫不全症として初めて発見された (Gottlieb, M. S., Schroff, R., et al., N. Engl. J. Med., 305, 1425-1430 (1981))。その2年後には、フランスのパストール研究所のモンタニエのグループにより、その原因ウイルスが発見された (Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., et al., Science, 220, 868-871 (1983))。1985年になり、この原因ウイルスは、HIV (Human immunodeficiency virus) (Coffin, J., Haase, A., et al., Science, 232, 697 (1986))と命名統一された。

上記AIDSは、セックス、輸血等を介してその原因ウイルスであるHIVに感染し、このHIVが感染者の免疫機能を破壊し、後天的に免疫系を不完全なものとし、その結果、下痢症、肺炎等の種々の症候を発現して宿主を死に至らしめる疾患である。

現在、上記AIDSの治療剤も多くの研究者によりその研究開発が進められており、例えば満屋らによるアジドチミジン (AZT) の発見 (Mitsuya, H., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 82, 7096 (1985)) 以来、dDI (2', 3' -dideoxyinosine) や dDC (2', 3' -dideoxycytidin) 等が臨床上で検討されてきているが、未だ満足な効果を示す薬剤は、開発されるに至っていない。

HIVの感染から発症までの期間（潜伏期間）には、かなりの個人差が認めら

れるが、約50%のヒトは確実に10年以内に発症し、発症後1～3年以内ではほぼ全員が死亡する。小児及び40歳以上では、感染後の進行は速い。感染から発症までの期間のばらつきの原因としては、感染者の全般的な健康状態や遺伝的素因、合併症、その他の宿主要因や、感染ウイルスの株の違い等が挙げられる。

血液製剤による感染の場合でも、HIV感染者の殆どはAIDSを発症して死亡するが、感染後10数年経った後も発症しない症例や、発症までに長期間かかる患者も認められる。このような例は、世界的に散見され、HIV感染者の5%位が長期生存すると報告されている。かかるHIV感染者の中に長期間無症状でいる、いわゆる長期生存者については、これらがHIVに対する抵抗性を示したり発症を防止したりするための機序を解明する手がかりを与えるのではないかとして注目され、またこれら長期生存者について種々の調査、研究等が行われている。

しかしながら、これら長期生存者がHIVに感染してもAIDSを発症しない理由については未だ充分に解明されておらず、HIVに対する抵抗性の解明及び当該理由に基づくHIV感染症治療剤の開発が望まれていた。

発明の開示

本発明者らも、上記HIV感染者の内の発症する症例と発症しない症例との相違につき、種々検討を重ね、その過程において、一部の感染者が有するある種の糖鎖に対する自然抗体のうちIgMが、上記発症に関与することを見出した。即ち、この抗原となる糖鎖は、普段は体内に微量しか存在しないか又は全く存在しないと考えられるが、HIV感染細胞では、この糖鎖がT細胞又はマクロファージの表面に出現する（一般に、細胞がウイルスに感染したり、腫瘍化すると特殊な糖鎖が細胞表面に発現することはよく知られている）。この糖鎖に対するIgMに属する抗体が自然抗体として血清中に存在する場合には、該抗体がHIV感染細胞を認識して該細胞と結合し、この反応に局所で活性化された補体成分が関与して、上記HIV感染細胞が溶解され、かくして上記自然抗体IgMを有する血清はHIV感染細胞が増殖しにくい環境を成立させることを見出した。更に、上記HIV感染細胞は、補体感受性が高まっていることも見出した。これ

らの事実は、インビトロ (in vitro) で確認されると共に、HIVに感染しながらも長期生存している感染者が実際にこのHIV感染細胞に反応性を有するIgMに属する抗体を保持することからも確認された。

また、通常補体に対して抵抗性を有する細胞は、これにガングリオテトラオース (Gg4) に対する抗体が結合することによって、補体により溶解されることが判った。更に、感染細胞に結合性を有するIgMに属する抗体は、補体の活性化による細胞溶解によって、感染細胞を消失させた。従って、このHIV感染細胞に反応するIgMに属する抗体の投与は、HIVキャリヤーの処置に有用であるとの知見が得られた。

すなわち、本発明、Gg4Cer ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) 又はGM2を認識し、IgMに属する糖鎖認識抗体を提供するものである。

また、本発明は、該糖鎖認識抗体を有効成分とするHIV感染症治療剤を提供するものである。

また、本発明は、該糖鎖認識抗体を含有するHIV感染症治療用組成物を提供するものである。

更に、本発明は、該糖鎖認識抗体のHIV感染症治療剤製造のための使用を提供するものである。

更にまた、本発明は、該糖鎖認識抗体の有効量を投与することを特徴とするHIV感染症患者の処置方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は検体番号1の血清についてのエピトープ解析結果を示すグラフである。

図2は検体番号56の血清についてのエピトープ解析結果を示すグラフである。

図3は、IgMを含むHIV抗体ネガティブな正常ヒト血清によるHIV感染-MOLT4の細胞溶解活性を示すグラフである。図4は、ノイラミニダーゼ処理したMOLT4、未処理MOLT4及びHIV-MOLT4の各細胞を、正常ヒト血清-1 (NHS-1) 由来IgM分画で処理後、蛍光標識した抗ヒトIgM抗体で免疫染色した結果を示すグラフである。図5は、種々の糖鎖でコートされ

たリポソームで吸収された IgM の残存細胞溶解活性及び該リポソームで処理された細胞の免疫染色結果を示すグラフである。図 6 は、 HIV 感染-MOLT 4 細胞上の補体不活化膜蛋白因子の発現量をフローサイトメトリーで測定した結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

本明細書における糖鎖の略号による表示は、当該分野で通常用いられている慣用法に従うものであり、 Gg はガングリオ (Ganglio) 、 Cer はセラミド (Ceramid) 、 Ga1 はガラクトース (Galactose) 、 Ga1NAc は N- アセチルガラクトース (N-acetylgalactose) 、 Glc はグルコース (Glucose) をそれぞれ示す。

本発明抗体は、 Gg4Cer 又は GM2 (ガングリオシド GM2 : II³αNeuAc-GgOse₃Cer) を認識し、免疫グロブリンクラスが IgM に属するものであればヒト血清から分離することもできるし、また Gg4Cer 又は GM2 を抗原として用いる通常の抗体製造法に従って製造することもできる。

まず、ヒト血清から本発明抗体を分離するには、 Gg4Cer 又は GM2 を抗原として通常の抗体のスクリーニング法に従って調製することができる。用いる血清としては、血清ネガティブな HIV 感染患者血清又は健常人血清のいずれでもよい。抗原として用いる Gg4Cer 及び GM2 は、常法、例えば EB ウィルスによるプラスト化法やハイブリドーマ法等により得ることができる。

また、上記スクリーニングに利用される技術としては、通常の ELISA 法、 RIA 法、蛍光抗体法、ドット-イムノバインディングアッセイ、ウエスタン-プロッティング法、 ⁵¹Cr-放出法等を例示することができる。

前記血清からの本発明抗体の精製は、一般によく知られている免疫グロブリンの精製方法を用いて、容易に実施することができる。該精製手段としては、例えば塩析法、ゲル濾過法等の他、アフィニティクロマトグラフィー (マンノース結合蛋白 (MBP) の除去に適したマンノースのポリマーを結合させたマンナンカラム等を使用) 等を例示できる。

また、本発明抗体は、Gg4Cer又はGM2を抗原として用いた通常の細胞融合法によって製造することもできる。また、本発明抗体はGg4Cer及び／又はGM2を認識し、IgMクラスに属するものであればモノクローナルでもポリクローナルでもよい。

本発明抗体は、HIV感染症の治療に有用である。このことは、以下のことから確認される。

本発明者らは、HIV-1感染T細胞株の細胞溶解を引き起こすヒト血清試料を得、これを用いて、HIV-1のHTLV-III B株に感染したヒトT細胞(MOLT 4)が、HIVキャリヤーの血清を含む試験した多くの血清によって溶解されないが、HIV抗体がネガティブの健康成人から得た新鮮血清(NHS)によって溶解されることを見出した。HIV感染細胞を溶解する活性を有する血清は、新鮮血清を最初にサンプルを採取した1年後にとっても、同程度の溶解活性を有していた。NHS-1の細胞溶解活性は、血清を56°Cで30分間の熱処理すると失活した。これに溶解活性のない新鮮血清(NHS-5)を加えると活性が戻った。これはこの溶解活性が補体を介していることを示唆している。なぜなら熱処理により補体が不活化することは知られているからである。

血清中にマンノースと結合する蛋白質(MBP; mannose binding protein)が、gp41 (C. F. Ebenbichler et al., J. Exp. med., 174, 1417 (1991))とHIVのgp120 (C. Sual et al., J. Immunol. Med., 152, 6028 (1994))と反応し、補体の活性を開始すると報告されている。マンナンカラムを用いてNHS-1からMBPを除いても細胞溶解活性は減少しなかった。

TSKゲルG3000SWでゲルfiltrationによりNHS-1を分画後、IgM画分がNHS-5のような細胞溶解活性のない血清によるHIV感染MOLT 4細胞(HIV-MOLT 4)の細胞溶解活性に対する感受性を付与する効果があることを見出した。それ故に、分画物中の細胞溶解活性に対する感受性を付与する効果は、マウス抗ヒトIgMモノクローナル抗体を結合したアフィニティカラムを通してことにより完全に除けた。このことは、IgMに属する抗体は血清補体によるHIV-MOLT 4の細胞溶解に対する感受性を付与するためであると考えら

れた。しかし、このIgMは、ウエスタンプロットで、HIV抗原とは反応しなかった。それ故、本発明者らはこの抗体に認識される抗原エピトープは、HIV感染によって生じる糖部分であろうと考えた。そこで、感染していないMOLT 4細胞のノイラミニダーゼによる処理を試みた所、アシアログリコ結合が認められるIgMと反応することを見出した。更に、ノイラミニダーゼ処理したMOLT 4細胞でIgM分画を吸収すると、ヒト正常血清による細胞溶解活性誘起性を有意に減少させた。

IgM分画は、GM1からシアル酸の除かれてできたGg4Cer ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta \text{Cer}$)のようある種のグリコシドと反応する。更に、Gg4を組み込んだリポソームは細胞溶解のためのIgMの活性を吸収した。ノイラミニダーゼ処理MOLT 4と同じくHIV-MOLT 4のGg4の抗原認識部位の存在は、抗マウスGg4モノクローナル抗体で免疫染色することにより確かめられた。また、これらの作用はHIV感染U-937細胞のGM2を認識するIgMにおいても確認された。

一方、細胞膜上において、補体活性は、(1)膜補体阻害剤である崩壊刺激因子(DAF: decay accelerating factor, A. Nicholson-Weller, J. Burge, D. T. Fearon, P. F. Weller, K. F. Austen, J. Immunol., 129, 184 (1982))、(2)膜補助蛋白(MCP: membrane cofactor protein, T. Seya, J. R. Turner, J. P. Atkinson, J. Exp. Med., 163, 837 (1986))やCD59(HRF20: 20kDa homologous restriction factor, N. Okada, R. Harada, T. Fujita, H. Okada, Int. Immunol., 1, 205 (1989); A. Davies et al., J. Exp. Med., 170, 637 (1989))のような特異的膜阻害剤により抑制されることが知られている。

他方、DAF、MCPやCD59の発現は、Fas抗原の発現を通して、ダウン・レギュレイトされており、HLA-DRの発現に変化を認めなかった。特に、HIV感染細胞におけるCD59の発現は、未感染MOLT 4細胞のそれの50%以下に低下していた。CD59発現のダウン・レギュレイトは、ノーザン・ blotにより測定されたmRNAのレベルでも認められた。

更に、CD59の発現低下により補体反応に対する抵抗性が弱まり、HIV感

染-MOLT 4は、IgMと正常ヒト血清補体により選択的な細胞溶解を起こす。溶解した細胞と溶解しなかった細胞の間のgapが発現の程度に違いはなかった。DAF、MCP、特にCD59のダウン・レギュレーションは、抗原-IgM複合体で活性化されるヒト補体によるHIV感染細胞の細胞溶解亢進に係わっているものと考えられる。更に、HIV感染細胞膜上の末端シアル酸の減少は補体の活性化を助長する。しかし、HIV感染細胞は、蛍光標識した抗ヒトIgG抗体によって検出されるIgGが結合していてもHIV抗体ネガティブ血清補体によって細胞溶解を受けない。

古典的経路を経るIgGによる補体の活性化のためには、極めて接近した2分子のIgGの反応が必要であるのに対し、IgMは1分子で充分である。それ故に、補体活性化は、IgGよりもIgMの方がより効果的な引き金となる。

更に、IgMによって開始された補体の活性化は、IgMは分子量が900kDaと巨大分子で、分子に結合した補体成分は、DAFやMCPのような標的細胞膜上の補体抑制分子の作用が及ばない故に、補体の膜上抑制や分子による拘束から逃れることが可能となる。他方、補体の活性化により生じた膜障害複合体(Membrane attack complex)は、細胞膜の脂質二重層に結合する。CD59は、膜に結合したこれらの抗原-抗体複合体の形成を抑制して細胞障害から守る役割を果たしているが、HIV感染細胞上でCD59の発現低下は、膜障害複合体に対する細胞の抵抗性を損なわしめ細胞溶解を助長することになる。

MOLT 4細胞と同じ結果が、CEMやMT4細胞のような、他のT細胞系でも得られた。HIV感染CEM細胞はCD59発現が減少し、IgMと補体による細胞溶解に感受性があった。しかし、HIV感染U937細胞等のマクロファージ系細胞では、CD59発現低下は認められず、IgMと補体による細胞溶解に抵抗性を示した。

IgMと補体を介する細胞溶解反応は、生体内でHIV感染T細胞を除去する役割を担っていると考えられる。HIV感染T細胞上に現れるGg4やGM2のような糖鎖抗原と反応する自然IgMを持っているヒトは、HIV感染に対し抑制的に作用しHIV感染の広がりを抑えることができると考えられた。しかし、HIV感染マクロファージは、IgMと補体による障害反応を免れて生き残り、

HIVの貯蔵庫として残る可能性は残るだろうが、感染Tリンパ球は除去されるので、IgM血清は、HIVキャリヤーの長期生存の1つの機構であろう。実際にHIV感染後12年以上生存している長期生存者20名について調べたところ、その全てがIgM保有者であり、短期発症者の5名はIgGのみでIgMを保有していなかった。

IgMが防御作用を示すという同様の機構がメラノーマ患者の場合に認められている(Ones, P. C., Sze, L. L., Morton, D. L. and Irie, R. F., J. Natl. Cancer Inst., 66, 249, 1980)。

以上のことより、本発明糖鎖IgMは、HIV感染患者に投与することによって、自然抗体を体内に保有させることができ、エイズの治療及び予防に有用である。

本発明IgMは、通常これを含む適当な形態、代表的には、注射剤等の非経口投与に適した形態等の製剤形態に調製され、治療を要望される患者に投与される。上記製剤形態の調製は、常法に従うことができ、該製剤形態への調製に利用される賦形剤等も一般的な、例えば糖、アミノ酸、蛋白質等の各種のものでよく、製剤中には、有効成分とする本発明IgMの他に、適当な添加剤、例えば各種無機塩類等を適宜添加配合することができる。上記各種形態での本発明製剤の投与量は、特に限定されるものではないが、一般には有効成分とする糖鎖に対するIgMの量(力価)が試験管内で10μg/ml~50μg/mlで、HIV感染細胞を殺す活性を持つものとするのがよい。

本発明抗体の上記投与によれば、HIV感染患者(エイズ)の治療、予防ができる。即ち、本発明糖鎖特異抗体をHIV感染患者に投与することによって、自然抗体の抗体価を体内で上昇させることができ、かくしてエイズの治療及び予防効果を期待できる。

実施例

以下、本発明を更に詳細に説明するため、実施例を挙げる。

実施例1：細胞の培養

ヒトT細胞系株MOLT4細胞は、10%牛胎児血清(FCS)、2mMグルタ

ミン、 $100\text{IU}/\text{ml}$ ペニシリン、 $100\text{mg}/\text{ml}$ ストレプトマイシンを含むRPMI・1640培地で培養し、マイコプラズマの存在しない状態で保存した。細胞は、HTLV-III B (HIV-1) を感染させ、HIV感染標的細胞として用いる前に4週間以上培養した細胞を用いた。0.5 βモノクローナル抗体 (HTLV-III Bのgp120に対する抗体) を用いてフローサイトメトリーにより測定した結果、細胞の95%以上がHIV-env抗原(gp120)陽性で、殆どの細胞にHIV-1の感染が行き亘っていることを確認した。

5×10^6 HIV感染MOLT 4細胞と、対照としてHIV未感染のMOLT 4細胞 (normal MOLT 4) とを、それぞれ ^{51}Cr で標識した。標識後、細胞を洗浄し、血清を含まないRPMI 1640培地に、 $2 \times 10^5/\text{ml}$ に再懸濁させた。

細胞懸濁液の $100\mu\text{l}$ を新鮮血清又は熱不活性血清の $100\mu\text{l}$ と共にU型マイクロプレートに入れた。上記血清は、4人のHIV抗体ポジティブ患者と、13人の健常HIV抗体ネガティブな人から得た。

上記プレートを 37°C で1.5時間反応させ、遠心分離を行った。細胞を含まない上清の ^{51}Cr 放出%を次式により算出した。

$$\begin{aligned} {}^{51}\text{Cr} \text{ 放出\%} &= (\text{新鮮血清で放出された量} - \text{熱処理血清で放出された量}) / \\ &\quad (\text{5\%トリトンX100で放出した量} - \text{熱処理血清で放出された量}) \end{aligned}$$

実施例2：ノイラミニダーゼ処理

$100\mu\text{l}$ のノイラミニダーゼを 2×10^6 細胞懸濁液 $100\mu\text{l}$ に加え、 37°C で45分反応させた。MOLT 4、Neu-MOLT 4又はHIV-MOLT 4細胞の 2×10^6 に対して溶解活性を強く示した血清であるNHS-1から分画精製したIgM ($250\mu\text{g}/\text{ml}$) を $250\mu\text{l}$ 加えて、 4°C で30分間反応させた。遠心分離後、上清は感受性の度合いを測定するために、他の試験管に移した。

細胞は洗浄後、FITC-結合マウス抗ヒトIgMで染色し、FACScanで測定した。

MOLT 4、Neu-MOLT 4又はHIV-MOLT 4の培養後得られた上清は、細胞溶解活性を測定するために、溶解活性陰性のヒト血清 (NHS-5)

の存在下でHIV-MOLT4と共に反応させた。

実施例3：

正常人96名の血清中から、実施例1と同様の方法により、 ^{51}Cr を取り込ませた標識感染MOLT4細胞の溶解活性法でスクリーニングした結果、感染細胞溶解活性が15%以上の人人が16名認められた。次いで、U937細胞及びMOLT4細胞の感染細胞を用いて、この二種類の感染細胞に対し溶解活性を有する血清2例を選別した。この血清のIgM画分を採取して以下の実験に供した。

リポソームはImmunology, 48:129-140(1983)に報告した方法に準じて作成した。すなわち、コレステロール、ジミリストイルホスファチジルコリン及び挿入すべき各種脂質を1:1:0.1の割合で混合し、溶媒のクロロホルムをロータリーエバボレーターで揮発除去して、脂質のフィルムをプラスコ内面に作成した。コントロールのリポソームはコレステロールとジミリストイルホスファチジルコリンを1:1にしたもの用いた。

脂質フィルムにPBSを加えてボルテックス攪拌器で強く振動させて、リポソーム（多重層型）を作成した。これにPBSを加えて遠心洗浄し、リポソーム浮遊液を作った。

このリポソーム浮遊液から10nmolの糖脂質を含む量を取り、これを遠心してリポソームをペレットにして上清を捨てた。このペレットにIgM分画($200\ \mu\text{g}/200\ \mu\text{l}$) (TSK-3000で抗体活性陽性血清をゲルfiltration分画したもの)を加えて攪拌した後、室温にて60分間放置して、リポソーム膜上の糖脂質に対する抗体を吸収する操作とした。反応後、遠心してリポソームを沈殿させ、上清を回収した。

この吸収操作後のIgM分画のHIV-感染MOLT4細胞(HIV-MOLT4)に対する細胞障害活性の測定を行った。すなわち、 ^{51}Cr で標識した $2 \times 10^5/\text{ml}$ の $^{51}\text{Cr}-\text{HIV}-\text{MOLT}4$ (コントロールには非感染の $^{51}\text{Cr}-\text{MOLT}4$ を用いた)を $100\ \mu\text{l}$ とり、これに $50\ \mu\text{l}$ の吸収あるいは吸収前のIgM分画と、 $50\ \mu\text{l}$ の抗体陰性正常人血清(補体源として)を加え、37°C、90分反応後、プレートを遠心して、上清に放出した ^{51}Cr の量を測定して細胞障害の度合を算出した。

すなわち、対象リポソーム、Gg4リポソーム、GM2リポソームは、それぞれリポソームのみのもの、リポソームにそれぞれGg2、GM2をつけたのもを新鮮血清に25% IgM画分を加え、抗原抗体反応を起こさせた後、その上清で溶解活性を調べた。その結果、図1及び図2に示したように検体番号1と56番共に、対照とGg4リポソームでは溶解活性は残存していたが、GM2リポソームに接触させると溶解活性は完全に消失した。この結果から、健常者血清のHIV感染細胞に対するIgM自然抗体は、GM2を抗原エピトープとするものであることが判明した。

実験例1：IgMを含むHIV抗体ネガティブな正常ヒト血清によるHIV-MOLT4の細胞溶解性

結果を図3に示す。該図において、横軸は細胞溶解活性% (% Cytolysis)、縦軸は供試患者血清(NHS-1～NHS-13及びPS-1～PS-4)をそれぞれ示す。また、該図3には、NHS-1、NHS-5及びPS-1の各血清試料と、HIV-MOLT4細胞との反応後の免疫染色結果(縦軸：染色細胞数(cell number)、横軸：標識強度(Fluorescence Intensity))を求めたグラフを(a)(IgM抗体利用の場合)及び(b)(IgG抗体利用の場合)として併記する。該図より次のことが明らかである。

(A) 健康なHIV抗体ネガティブの供与者13人の内、1人だけ(NHS-1)がヒト血清による⁵¹Crを標識したHIV-MOLT4の細胞溶解を起こした。

該NHS-1では、43%以上の細胞溶解が見られたのに対して、健常者(NHS-2からNHS-13の12人)からの他の血清は、細胞溶解作用は殆ど認められなかった。また、HIV抗体ポジティブの患者血清(PS-1～PS-4)でも溶解活性は殆ど認められなかった。

(B) HIV-MOLT4細胞をNHS-1、NHS-5又はPS-1のそれぞれの血清試料の等容量と室温で30分間反応処理し、洗浄後、FITC標識抗ヒトIgM抗体又はFITC標識抗ヒトIgG抗体で免疫染色した。

結果は図3の(a)及び(b)に示す通りであり、NHS-1で処理したHIV-MOLT4細胞は、抗IgM抗体と結合し、PS-1は抗IgGに結合

したが抗 IgM抗体には反応しなかった。

実験例2：

ノイラミニダーゼ処理したMOLT 4、未処理MOLT 4及びHIV-MOLT 4の各細胞を、NHS-1由来IgM抗体分画で処理後、蛍光標識した抗ヒトIgM抗体で免疫染色した結果を、図3の(a)と同様にして、図4に示す。尚、HIV-MOLT 4に反応したIgM抗体は、ノイラミニダーゼで処理したHIV-MOLT 4細胞とも反応した。

その結果、図4の(a)に示す通り、NHS-1からのIgM画分は、HIV-MOLT 4との反応性と同様の強さでNeu-MOLT 4とも反応した。また、同様に試験した抗gp120モノクローナル抗体(anti-gp120、O. 5 β)は、同図4の(b)に示すように、HIV-MOLT 4のみに染色した。

ヒト血清による細胞溶解を誘導するIgM画分の活性は、このIgM分画をNeu-MOLT 4細胞で吸収処理することによって、HIV-MOLT 4と同様に活性を吸収した。即ち、之等の細胞で吸収処理を行ったIgM分画は、正常ヒト血清(溶解活性陰性のNHS-5)に溶解力を誘導する力を失った。

実験例3：

HIV-MOLT 4に反応性を有するIgMは、Gg4Cerに反応する。

(A) 下記1～7の種々のグリコリビッドにつき、プラスチックTLCプレート上でクロマトグラフを行って、(a) オルシノール-硫酸試薬と、NHS-1から得たIgM画分で免疫染色を行ってスポットを検出した。また、(b) NHS-1から得たIgM画分でTLC免疫染色法でスポットを検出した。

1. LacCer
2. Gg3Cer
3. nLc4Cer
4. Lc4Cer
5. Gb4Cer
6. Gg4Cer
7. IV³Gal α -nLc4Cer

その結果、Gg4Cerは明らかに染色された。また、LacCer、Gg3CerとLc4Cerはごく僅かに染色された。しかし、IgM画分はnLe4Cer、Gb4Cer、IV³Gal α -nLc4Cerと、そしてGM3、GM2、GM1、GD ℓ a、GD1b、GT1b、GQ1b、IV³NeuAc α -nLc4Cer、シアリルLe^aとLe^xのようなシアリル化されたグリコリビッドが僅かに反応した。

Gg4Cerを100として比較すると、LacCerは25.8、Gg3Cerは31.8、nLc4Cerは0、Lc4Cerは29.3、Gb4Cerは0、そしてIV³Galα-nLc4Cerは24.6であった。

リポソームは岡田等の方法により(Okada, N., Yoshida, T., Okada, H., Nature, 299, 261 (1982))調製した。IgM分画(50μg/200μl)を各リポソーム標品の5nmolと混合し、遠心分離後、上清の細胞溶解活性を実施例2に従って測定した。

溶解活性陰性のヒト血清(NHS-5)によるHIV-MOLT4の細胞溶解を誘起するIgM分画の活性は、Gg4-リポソームの処理により半分以下に低下した(図5のA参照)。

Gg4に対するマウスモノクローナル抗体は、フローサイトメトリーで測定したところ、正常(normal)MOLT4細胞とは反応しなかったが、HIV-MOLT4細胞とNeu-MOLT4とは反応した(図5のB参照)。

実験例4：HIV-MOLT4細胞上のCD59の有意な減少

(A) フローサイトメトリーで測定した結果、HIV感染細胞上の膜上補体制御因子(DAF, MCP及びCD59)の発現は減少していた。Fas抗原とHLA-DRの発現はHIV感染後も低下していなかった(図6参照)。

(B) 膜上補体制御因子のmRNAのノーザン・プロット解析は、非感染(N)とHIV感染した(H) MOLT4細胞から全RNAの5μgをThomas, P. S., Methods Enzymol., 100, 255-2, (1983)等の方法により抽出し、グリオキサールとDMSOで変性させた。CD59、DAF、MCPとGAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase)のcDNAフラグメントをプローブとして用いた。CD59 mRNAの明瞭な減少が見られた。

1×10⁶個の細胞とNHS-1とを37°Cで30分反応させた後、HIV-MOLT4に対してTwo color分析を行った。死細胞を染色する沃化プロピオジュウム(P1)を用いた。これにより該P1で染色する死細胞と染色しない生細胞を分別できる。そしてC5b-9(MAC)、CD59とgp120はそれらを抗原とするFITC標識モノクローナル抗体で染色した。その結果は次の通りである。

- (a) N H S - 1と共に反応させた後のP I染色細胞(死細胞)は、C 5 b - 9の量が多く、生細胞であることを示すP I染色陰性細胞よりもやや強く染色した。
- (b) 10 mM EDTA存在下ではN H S - 1はP I染色細胞を生じさせない。
- (c) C D 5 9の発現量の低い細胞がN H S - 1との処理後のP I染色される結果を示しており、C D 5 9の発現量の低い細胞がよく殺され易いことが判る。
- (d) g p I 2 0の発現はP I染色(死細胞)と非染色(生細胞)細胞で本質的に同じであり、抗g p I 2 0抗体量とN H S - 1による殺細胞活性とは直接関係しないことが判る。

産業上の利用可能性

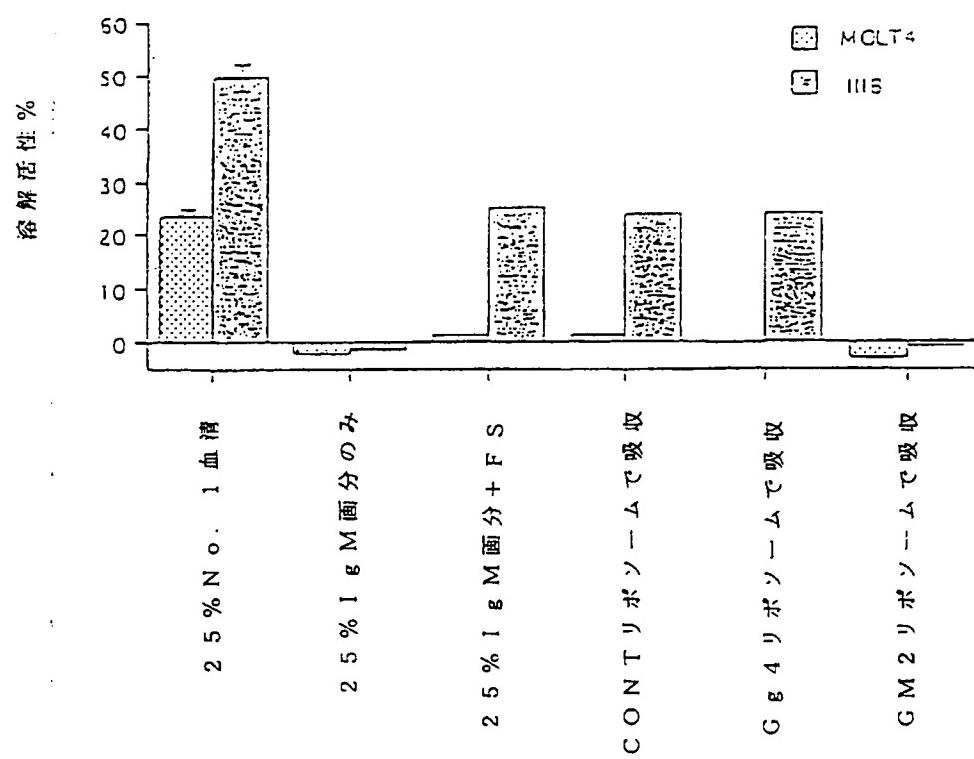
本発明の糖鎖認識抗体をH I V感染患者に投与すれば、当該抗体の作用により補体の活性化を介してH I V感染細胞が溶解することから、A I D Sを治療又は予防することができる。

請求の範囲

1. Gg4Cer ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) 又はGM2を認識し、IgMに属する糖鎖認識抗体。
2. Gg4Cer ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) 又はGM2を認識し、IgMに属する糖鎖認識抗体を有効成分とするHIV感染症治療剤。
3. 該糖鎖認識抗体が、補体の活性化を介してHIV感染細胞を溶解せしめるものである請求項2記載の治療剤。
4. Gg4Cer ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) 又はGM2を認識し、IgMに属する糖鎖認識抗体を含有するHIV感染症治療用組成物。
5. 該糖鎖認識抗体が、補体の活性化を介してHIV感染細胞を溶解せしめるものである請求項4記載の組成物。
6. Gg4Cer ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) 又はGM2を認識し、IgMに属する糖鎖認識抗体のHIV感染症治療剤製造のための使用。
7. 該糖鎖認識抗体が、補体の活性化を介してHIV感染細胞を溶解せしめるものである請求項6記載の使用。
8. Gg4Cer ($\text{Gal}\beta 1-3\text{GalNAc}\beta 1-4\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta \text{Cer}$) 又はGM2を認識し、IgMに属する糖鎖認識抗体の有効量を投与することを特徴とするHIV感染症患者の処置方法。
9. 該糖鎖認識抗体が、補体の活性化を介してHIV感染細胞を溶解せしめるものである請求項8記載の処置方法。
10. AIDSの発症を防止するためのものである請求項8記載の処置方法。

図 1

自然抗体のヒアープ解析（検体番号 1）

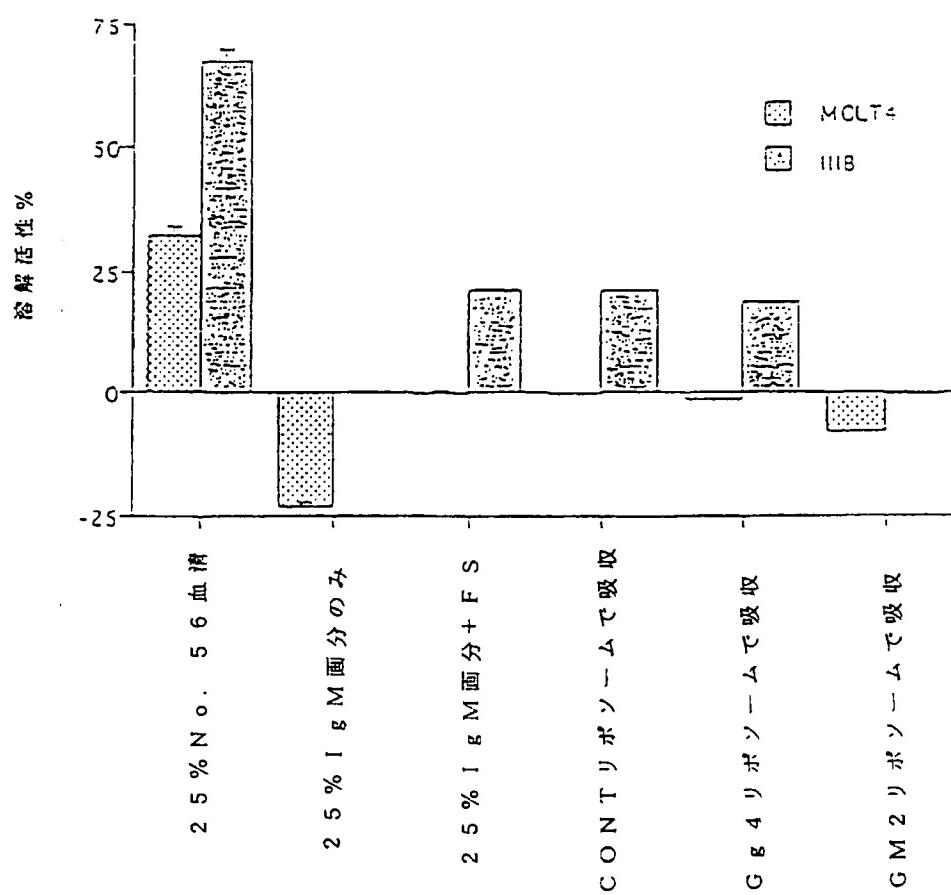


1 / 6

差替え用紙(規則26)

図 2

自然抗体のエピトープ解析（検体番号 56）

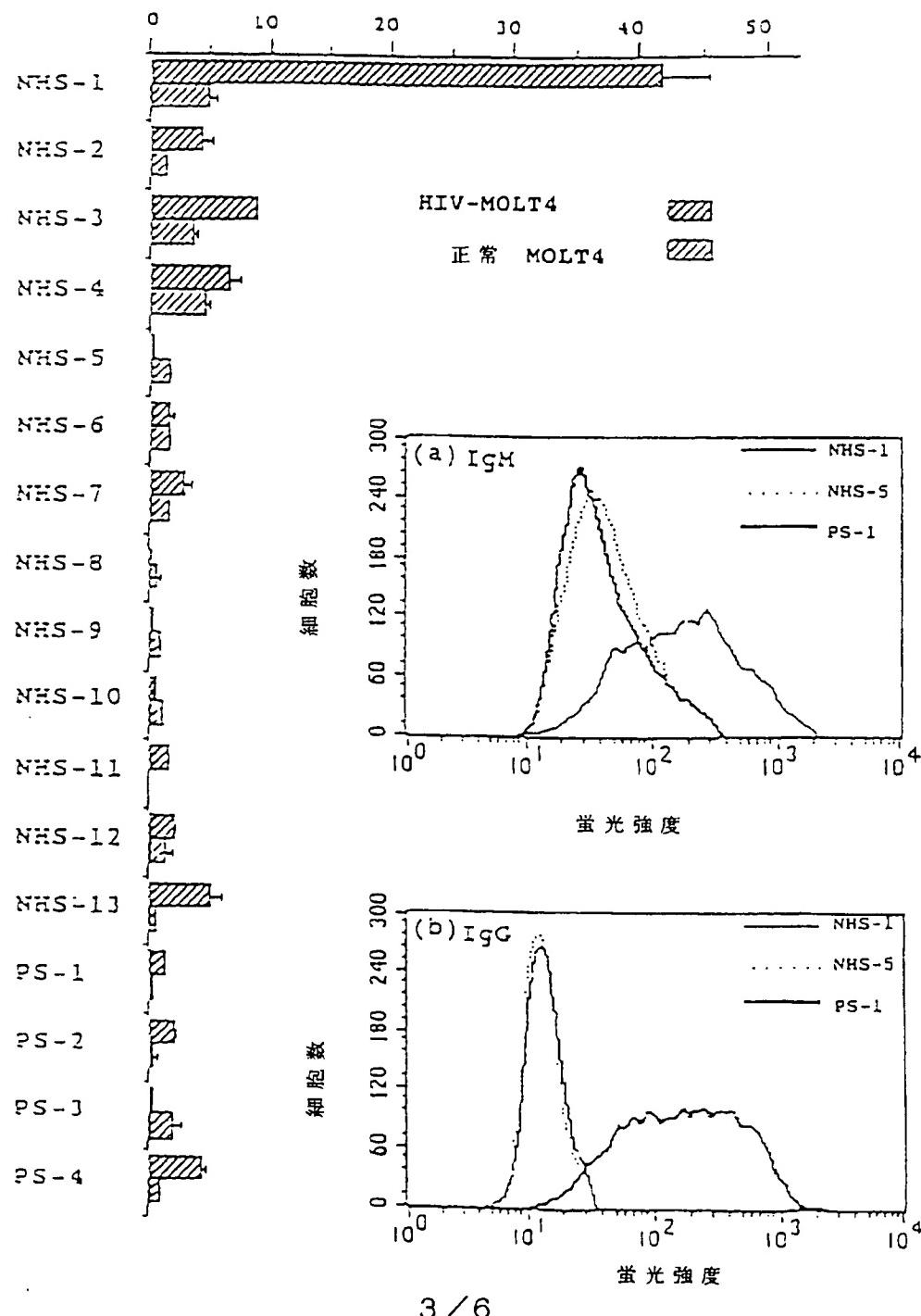


2 / 6

差替え用紙(規則26)

図 3

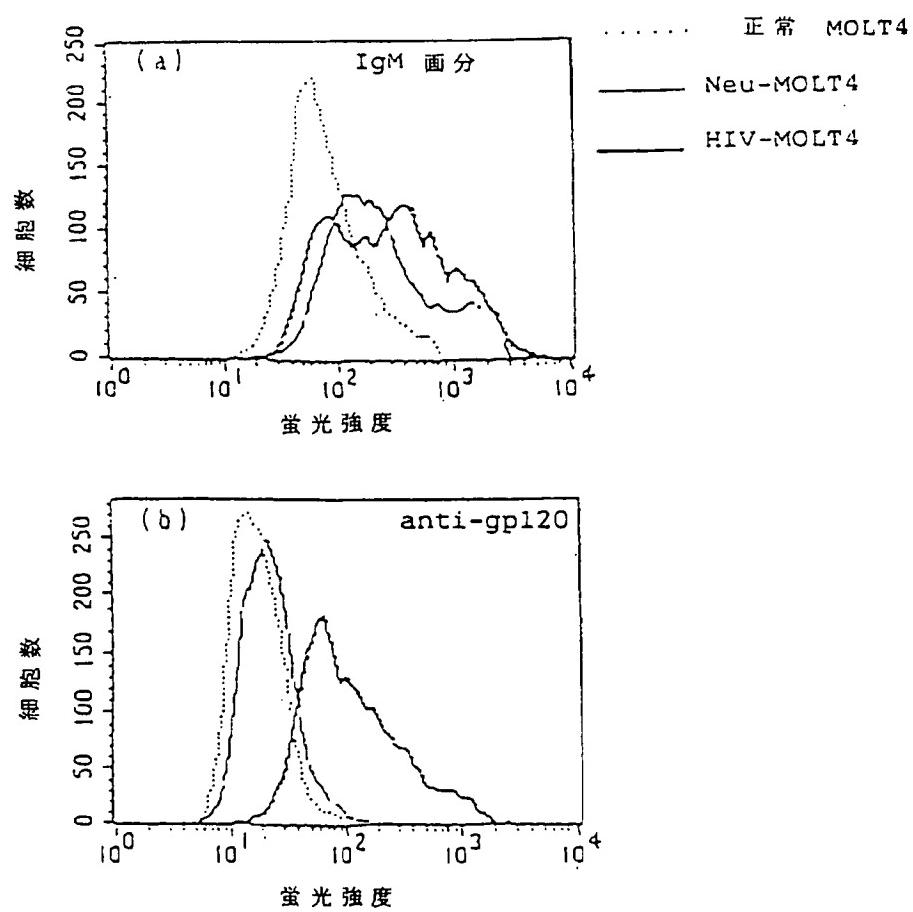
%細胞溶解活性



3 / 6

差替え用紙(規則26)

図 4

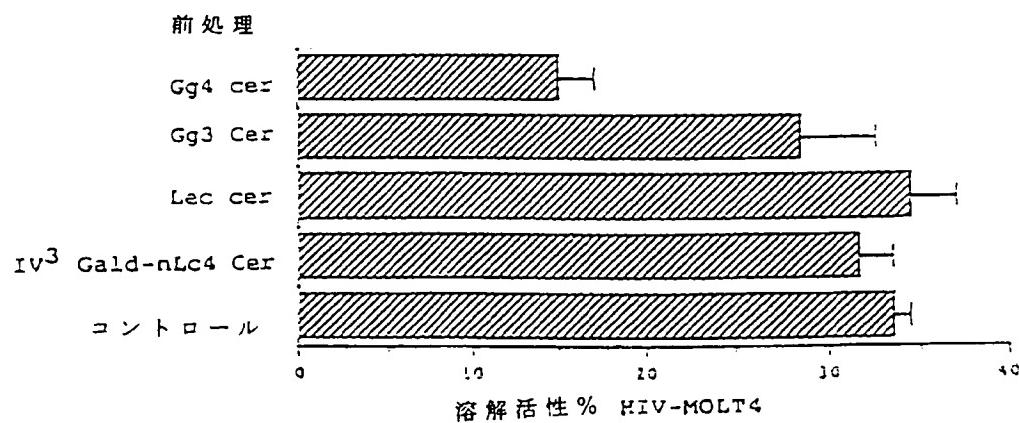


4 / 6

差替え用紙(規則26)

図 5

(A)



(B)

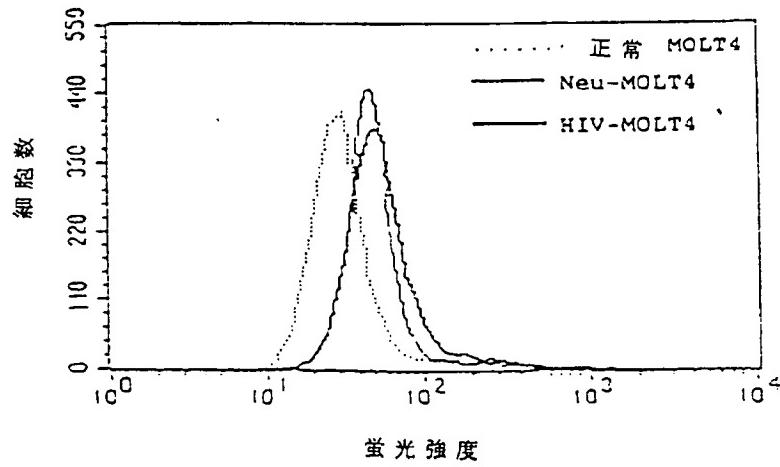
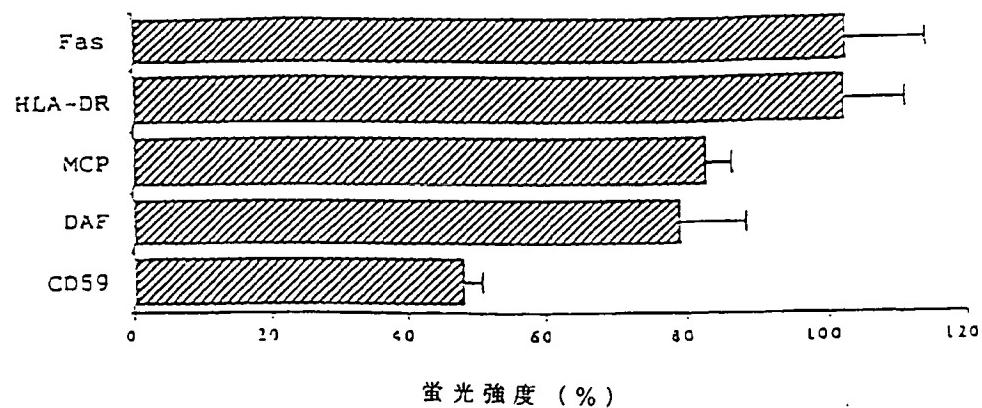


図 6



6 / 6

差替え用紙(規則26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03673

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ A61K39/395, C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ A61K39/395, C07K16/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WATARAI, Shinobu et al., Application of Liposomes to Generation of Monoclonal Antibody to Glycosphingolipid:Production of monoclonal Antibody to GgOse ₄ Cer J. Biochem. 1987, Vol. 102, No. 1, pp. 59-67	1
X	SANAI, Yutaka et al., Monoclonal antibody directed to a Hanganutziu-Deicher active ganglioside, GM ₂ (NeuGc), Biochimica et Biophysica Acta, 1988, Vol. 958, pp. 368-374	1
X	VRIONIS, Fotis D. et al., Five New Epitope-defined Monoclonal Antibodies Reactive with GM ₂ and Human Glioma and Medulloblastoma Cell Lines, Cancer Res., 1989, Vol. 49, pp. 6645-6651	1
X	LIVINGSTON, Philip O. et al., Characterization of IgG and IgM Antibodies Induced in Melanoma Patients by Immunization with Purified GM ₂ Ganglioside, Cancer Res., 1989, Vol. 49, pp. 7045-7050	1

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
 - "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 - "E" earlier document but published on or after the international filing date
 - "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 - "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 - "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search March 12, 1997 (12. 03. 97)	Date of mailing of the international search report March 25, 1997 (25. 03. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03673

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIRAIWA, Nozomu et al., Gangliosodes and Sialoglycoproteins Carrying a Rare Blood Group Antigen Determinant, Cad, Associated with Human Cancers as Detected by Specific Monoclonal Antibodies, Cancer Res., 1990, Vol. 50, pp. 5497-5503	1
X	OHTA, So et al., Cytotoxicity of Adriamycin-Containing Immunoliposomes Targeted with Anti-Ganglioside Monoclonal Antibodies, Anticancer Research, 1993, Vol. 13, pp. 331-336	1
X	SHITARA, Kenya et al., "Immunoglobulin class switch of anti-ganglioside monoclonal antibody from IgM to IgG, Journal of Immunological Methods, 1994, Vol. 169, pp. 83-92	1
X	GUIJO, Carmen Garcia et al., Presence of anti-ganglioside antibodies in healthy persons, motor neuron disease, peripheral neuropathy, and other diseases of the nervous system, Journal of Neuroimmunology, Vol. 56, 1995, pp. 27-33	1
X	LIVINGSTON, Philip O. et al., Vaccines containing purified GM2 ganglioside elicit GM2 antibodies in melanoma patients, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, Vol. 84; pp. 2911-2915	1
X	DeGASPERI, Rita et al., Isolation and Characterization of Gangliosides with Hybrid Neolacto-Ganglio-type Sugar Chains, J. Biol. Chem., 1987, Vol. 262, No. 35, pp. 17149-17155	1
X	ILYAS, Amjad A. et al., Gangliosides GM ₂ , IV ⁴ GalNAcGM _{1b} , and IV ⁴ GalNAcG _{D1a} as Antigens for Monoclonal Immunoglobulin M in Neuropathy Associated with Gammopathy, J. Biol. Chem., 1988, Vol. 263, No. 9, pp. 4369-4373	1
X	NAKAO, Toru et al., Novel Lacto-Ganglio Type Gangliosodes with GM ₂ -epitope in Bovine Brain Which React with IgM from a Patient of the Amyotrophic Lateral Sclerosis-like Disorder, J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268, No. 28, pp. 21028-21034	1
X	NAKAMURA, Kazuyasu et al., Chimeric Anti-Ganglioside GM ₂ Antibody with Antitumor Activity, Cancer Res., 1994, Vol. 54, pp. 1511-1516	1
X	KITAMURA Kunio et al., Serological response patterns of melanoma patients immunized with a GM2 ganglioside conjugate vaccine, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, March 1995, Vol. 92,	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03673

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	pp. 2805-2809	
A	MATSUDA, Kazuhiro, Glycosphingolipid compositions of human T-lymphotropic virus type 1(HTLV-1) and human immunodeficiency virus(HIV)-infected cell lines, Biochimica et Biophysica Acta, 1993, Vol. 1168, pp. 123-129	2 - 7
A	MCALARNEY, T. et al., SPECIFICITY AND CROSS-REACTIVITY OF ANTI-GALACTOCEREBROSIDE ANTIBODIES, Immunological Investigations, 1995, Vol. 24, No. 4, pp. 595-606	2 - 7
A	LONG, Deborah et al., Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Binding to Liposomes Containing Galactosylceramide, Journal of Virology, 1994, Vol. 68, No. 9, pp. 5890-5898	2 - 7
A	COOK, Davis G. et al., Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1(HIV-1) Gp120 to Galactosylceramide(GalCer):Relationship to the V3 Loop, Virology, 1994, Vol. 210, pp. 206-214	2 - 7

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/03673

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 8 - 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 8 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int Cl. * A61K39/395, C07K16/28

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int Cl. * A61K39/395, C07K16/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WATARAI, Shinobu et al, Application of Liposomes to Generation of Monoclonal Antibody to Glycosphingolipid:Production of Monoclonal Antibody to GgOse.Cer J. Biochem. 1987, Vol.102, No.1, pp.59-67	1
X	SANAI, Yutaka et al, Monoclonal antibody directed to a Hanganutziu-Deicher active ganglioside, G _{M2} (NeuGc), Biochimica et Biophysica Acta, 1988, Vol.958 pp. 368-374	1
X	VRIONIS, Fotis D. et al, Five New Epitope-defined Monoclonal Antibodies Reactive with G _{M2} and Human Glioma and Medulloblastoma Cell Lines, Cancer Res., 1989, Vol.49, pp. 6645-6651	1

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
12.03.97

国際調査報告の発送日

25.03.97

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

4C 9284

添付下告一
電話番号 03-3581-1101 内線 3453

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	LIVINGSTON.Phillip O. et al. Characterization of IgG and IgM Antibodies Induced in Melanoma Patients by Immunization with Purified GM ₂ Ganglioside. Cancer Res., 1989, Vol. 49, pp. 7045-7050	1
X	HIRAIWA.Nozomu et al. Gangliosides and Sialoglycoproteins Carrying a Rare Blood Group Antigen Determinant. Cad. Associated with Human Cancers as Detected by Specific Monoclonal Antibodies. Cancer Res., 1990, Vol. 50, pp. 5497-5503	1
X	OHTA.So et al. Cytotoxicity of Adriamycin-Containing Immunoliposomes Targeted with Anti-Ganglioside Monoclonal Antibodies. Anticancer Research, 1993, Vol. 13, pp. 331-336	1
X	SHITARA.Kenya et al. Immunoglobulin class switch of anti-ganglioside monoclonal antibody from IgM to IgG. Journal of Immunological Methods, 1994, Vol. 169, pp. 83-92	1
X	GUIJO.Carmen Garcia et al. Presense of anti-ganglioside antibodies in healthy persons, motor neuron disease, peripheral neuropathy, and other diseases of the nervous system. Journal of Neuroimmunology, Vol. 56, 1995, pp. 27-33	1
X	LIVINGSTON.Phillip O. et al. Vaccines containing purified GM ₂ ganglioside elicit GM ₂ antibodies in melanoma patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, Vol. 84, pp. 2911-2915	1
X	DeGASPERI.Rita et al. Isolation and Characterization of Gangliosides with Hybrid Neolacto-Ganglio-type Sugar Chains. J. Biol. Chem., 1987, Vol. 262, No. 35, pp. 17149-17155	1
X	ILYAS.Amjad A. et al. Gangliosides GM ₂ , IV'GalNAcGM ₁ , and IV'GalNAcG ₁ , as Antigens for Monoclonal Immunoglobulin M in Neuropathy Associated with Gammopathy. J. Biol. Chem., 1988, Vol. 263, No. 9, pp. 4369-4373	1
X	NAKAO.Toru et al. Novel Lacto-Ganglio Type Gangliosides with GM ₂ -epitope in Bovine Brain Which React with IgM from a Patient of the Amyotrophic Lateral Sclerosis-like Disorder. J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268, No. 28, pp. 21028-21034	1
X	NAKAMURA.Kazuyasu et al. Chimeric Anti-Ganglioside GM ₂ Antibody with Antitumor Activy. Cancer Res., 1994, Vol. 54, pp. 1511-1516	1
X	KITAMURA.Kunio et al. Serological response patterns of melanoma patients immunized with a GM ₂ ganglioside conjugate vaccine. Proc. Natl. Acad. Sci., USA March 1995, Vol. 92, pp. 2805-2809	1
A	MATSUDA.Kazuhiro. Glycosphingolipid compositions of human T-lymphotropic virus type 1(HTLV-1) and human immunodeficiency virus(HIV)-infected cell lines. Biochimica et Biophysica Acta, 1993, Vol. 1168, pp. 123-129	2-7
A	McALARNEY.T. et al. SPECIFICITY AND CROSS-REACTIVITY OF ANTI-GALACTOCEREBROSIDE ANTIBODIES. Immunological Investigations, 1995, Vol. 24, No. 4, pp. 595-606	2-7

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LONG, Deborah et al, Characterization of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Binding to Liposomes Containing Galactosylceramide, Journal of Virology, 1994, Vol. 68, No. 9, pp. 5890-5898	2-7
A	COOK, Davis G. et al, Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Gp120 to Galactosylceramide (GalCer): Relationship to the V3 Loop, Virology, 1994, Vol. 210, pp. 206-214	2-7

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/03673

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの1の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 8-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲 8-10 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)

(i) 及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない
国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に
従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの2の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT OR DRAWING
- BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- GRAY SCALE DOCUMENTS
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- OTHER: _____

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning documents *will not* correct images
problems checked, please do not report the
problems to the IFW Image Problem Mailbox**